

P-091

Does p53 function affect the sensitivity of the Comet Assay?

Yu F Sasaki

Hachinohe National College of Technology

Although the comet assay, a procedure for quantitating DNA lesions in mammalian cells, is considered to be sensitive, its sensitivity has not been ever ascertained to be higher than the sensitivity of other genotoxicity procedures in mammalian cells. To know whether p53 function affects the sensitivity of this assay, we compared the results of the comet assay in p53 mutant WTK1 cells and p53 wild TK6 cells in the presence and absence of DNA repair inhibitors. Cells were exposed for 2 h to MNU, ENU, MMS, EMS, BLM, and UVC in the presence and absence of araC and hydroxyurea. Immediately after the exposure, slides for the comet assay were prepared. In the absence of DNA repair inhibitors, lowest genotoxic concentrations/dose (LGCs/LGD) were lower in WTK1 than in TK6, showing p53 function reduce comet sensitivity. On the other hand, in the presence of DNA repair inhibitors, LGCs/LGD were almost same in WTK1 and in TK6. In the presence of DNA repair inhibitors, positive response by UVC irradiation was observed earlier in TK6 than in WTK1 cells. Therefore, SSB formation during the nucleotide excision repair process would occur earlier in TK6 than in WTK1 cells, which results in lowering of Comet sensitivity in p53 wild cells.

遺伝子産物のコメットアッセイの感度に及ぼす影響

佐々木有

八戸工業高等専門学校

p53 遺伝子産物のコメットアッセイの感度に及ぼす影響を p53 野生型の TK6 と p53 変異型の WTK1 細胞を用いて検討した。細胞を DNA 修復阻害剤の araC と hydroxyurea の存在下と非存在下で変異原 (MNU, ENU, MMS, EMS, BLM, UVC) に 2 時間暴露した後、コメットアッセイ標本を作製し、コメットアッセイが陽性になる変異原の最低濃度また最低用量 (LGC/LGD) を求めた。DNA 修復阻害剤非存在下では、用いたすべての変異原について LGC/LGD は WTK1 のほうが TK6 よりも低かった。一方、DNA 修復阻害剤存在下では、用いたすべての変異原について LGC/LGD は WTK1 と TK6 でほぼ同等であった。DNA 修復阻害剤存在下において、UVC 照射後のコメットの陽性反応は WTK1 のほうが TK6 よりも早期にみられた。以上のことから、p53 遺伝子産物が機能している細胞では DNA 初期損傷からの SSB の生成がより早い段階におきること、その結果として SSB の消失も p53 遺伝子産物が機能している細胞のほうが早くおきること、p53 遺伝子産物が機能している細胞では SSB の消失によるコメットアッセイの感度の見かけの低下がおきていることが示唆された。

P-092

The threshold of *N*-ethyl-*N*-nitrosourea-induced mutagenesis in thymocytes of B6C3F1 *gpt*-delta mice

Tomoko Sawai, Kazumi Yamauchi, Shizuko Kakinuma, Yoshiya Shimada

Experimental Biology for Children's Health Research Group, National Institute of Radiological Sciences

Current strategy for estimating the risks of genotoxic substances at low-dose is a linear extrapolation from the effects observed at high doses. It has been generally considered that genotoxic carcinogens have no threshold in exerting their potential for cancer induction. However, a few animal studies reported the existence of a threshold for carcinogenicities.

Previously, we observed a threshold for the *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU)-induced thymic lymphoma in B6C3F1 mice. In the present study, we examined the dose response of occurrence of mutations in thymic DNA following the exposure of B6C3F1 *gpt*-delta mice to ENU. After the ENU treatment at doses 0.8 to 200ppm, mice were sacrificed, thymic DNA was prepared, and the number of mutations in the reporter transgene *gpt* was quantitated. ENU exposure at 200ppm increased mutant frequency by 15-fold. ENU at 50ppm also increased it by 6-folds, while it did not induce thymic lymphoma, denying a parallelism between mutation and lymphoma induction. Surprisingly, 0.8ppm exposure significantly reduced the frequency compared to untreated controls, suggesting a preventive effect. These results suggest that the effect of low dose ENU cannot be linearly extrapolated from the effect of high dose ENU, and that there may be a threshold for mutation induction by ENU. We will also report on the mutational spectra of the study.

The study was supported partly by a grant of LRI by JCIA.

マウス T 細胞白血病発生における遺伝毒性発がん物質 (エチルニトロソウレア) 変異誘発における閾値

澤井知子, 山内一己, 柿沼志津子, 島田義也

放射線医学総合研究所 発達期被ばく健康影響グループ

現在、化学発がん物質の低用量曝露での発がんリスクは、高用量曝露の発がんデータの直線外挿により推定されており、閾値はないとされている。しかし、近年ラットを用いた低用量域での発がん性試験で、複素環アミン類や N-ニトロソ化合物の閾値が実験的に存在することが報告され、遺伝毒性を持つ化学発がん物質に閾値が存在する可能性が示された。

本研究グループでは、エチルニトロソウレア (ENU) を用いたマウス胸腺リンパ腫 (TL) の誘発実験により TL の発生に閾値があることを明らかにした。そこで、TL の発生が認められない濃度での生体への影響を調べるため、低用量域での変異蓄積について解析を行った。具体的には、4 週齢の変異解析用 *gpt*-delta トランスジェニックマウスに ENU を 4 週間飲水投与した。曝露後、マウスの胸腺を採取し DNA を調整した後、EG10 フェージとして回収し、このフェージを大腸菌に感染させ選択培地で形成されるコロニー数から突然変異体数頻度を算出した。非処理群では突然変異体数頻度は 0.46×10^{-5} であった。ENU200ppm により突然変異体数頻度は 6.95×10^{-5} (15 倍) に増加し、50ppm でも 2.71×10^{-5} (6 倍) に増加した。50ppm は TL を発生させない閾値用量であったので、ある程度突然変異が増加しても、発がんには至らないことが示唆された。また、おどろいたことに、0.8ppm では突然変異体数頻度が非処理群に比べ有意に低い値を示し、変異蓄積にも閾値が存在することが示された。さらに、蓄積される変異のスペクトラム解析を行い、その結果について報告したい。本研究の一部は、日本化学工業協会が推進する LRI により支援されました。